UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER N° 15

FACULTÉ DE MÉDECINE

L'IMPORTANCE DE LA PHAGOCYTOSE DANS L'IMMUNITÉ DE LA SOURIS A L'ÉGARD DE QUELQUES FLAGELLÉS

(TRAVAIL DE PATHOLOGIE EXPÉRIMENTALE)

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue à la Faculté de Médecine de Montpellier

Le 23 Décembre 1911

PAR

Pierre DELANOË

Né à Saint-Denis (Ile de la Réunion), le 25 mai 1882

Ancien externe des Hôpitaux de Montpellier (Concours 1903)
Ancien aide de Clinique médicale de la Faculté (Concours 1906)
Lauréat de la Faculté de Médecine (Concours du Prix Swiecickii)
Lauréat de l'Académie de Montpellier (Prix Jaumes)
Ancien aide-préparateur et préparateur de l'Institut Bouisson-Bertrand
Boursier de l'Institut Pasteur de Paris

Pour Obtenir le Grade de Docteur en Médecine

Examinateurs de la Thèse
- FORGUE, Professeur, *Président.*
- RAUZIER, Professeur
- GALAVIELLE, Agrégé
- GAUSSEL, Agrégé

Assesseurs.

PARIS

IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL

L. MARETHEUX, Directeur.

1, RUE CASSETTE, 1

1911

L'IMPORTANCE DE LA PHAGOCYTOSE

DANS L'IMMUNITÉ DE LA SOURIS

A L'ÉGARD DE QUELQUES FLAGELLÉS

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER N° 15

FACULTÉ DE MÉDECINE

L'IMPORTANCE DE LA PHAGOCYTOSE

DANS L'IMMUNITÉ DE LA SOURIS

A L'ÉGARD DE QUELQUES FLAGELLÉS

(TRAVAIL DE PATHOLOGIE EXPÉRIMENTALE)

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue à la Faculté de Médecine de Montpellier

Le 23 Décembre 1911

PAR

Pierre DELANOË

Né à Saint-Denis (Ile de la Réunion), le 25 mai 1882

Ancien externe des Hôpitaux de Montpellier (Concours 1903)
Ancien aide de Clinique médicale de la Faculté (Concours 1906)
Lauréat de la Faculté de Médecine (Concours du Prix Swiecickii)
Lauréat de l'Académie de Montpellier (Prix Jaumes)
Ancien aide-préparateur et préparateur de l'Institut Bouisson-Bertrand
Boursier de l'Institut Pasteur de Paris

Pour Obtenir le Grade de Docteur en Médecine

Examinateurs de la Thèse : FORGUE, Professeur, *Président.* ; RAUZIER, Professeur ; GALAVIELLE, Agrégé ; GAUSSEL, Agrégé — *Assesseurs.*

PARIS

IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL

L. MARETHEUX, Directeur.

1, RUE CASSETTE, 1

1911

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Administration

MM. MAIRET (✲)	Doyen.
SARDA	Assesseur.
IZARD	Secrétaire.

Professeurs

Clinique médicale	MM. GRASSET (✲), Chargé de l'enseignement de pathol. et thérap. génér.
Clinique chirurgicale	TEDENAT (✲).
Clinique médicale	CARRIEU.
Clinique des maladies mentales et nerveuses	MAIRET (✲).
Physique médicale	IMBERT.
Botanique et histoire naturelle médicales	GRANEL.
Clinique chirurgicale	FORGUE (✲).
Clinique ophtalmologique	TRUC (✲).
Chimie médicale	VILLE.
Physiologie	HEDON.
Histologie	VIALLETON.
Pathologie interne	DUCAMP.
Anatomie	GILIS (✲).
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	ESTOR.
Microbiologie	RODET.
Médecine légale et toxicologie	SARDA.
Clinique des maladies des enfants	BAUMEL.
Anatomie pathologique	BOSC.
Hygiène	BERTIN-SANS (H.).
Pathologie et thérapeutique générales	RAUZIER. Chargé de l'enseignement de la clinique médicale.
Clinique obstétricale	VALLOIS.
Thérapeutique et matière médicale	VIRES.

Professeurs adjoints : MM. de ROUVILLE, PUECH, MOURET.

Doyen honoraire : M. VIALLETON.

Profes. honoraires : MM. E. BERTIN-SANS (✲), GRYNFELTT, HAMELIN (✲).

Secrétaire honoraire : M. GOT.

Chargés de Cours complémentaires

Clinique ann. des mal. syphil. et cutanées	MM. VEDEL, agrégé.
Clinique annexe des maladies des vieillards	LEENHARDT, agr., ch. de c.
Pathologie externe	LAPEYRE, agr. lib., ch. de c.
Clinique gynécologique	De ROUVILLE, prof. adj.
Accouchements	PUECH, profes. adjoint.
Clinique des maladies des voies urinaires	JEANBRAU, ag. lib., ch. de c.
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	MOURET, prof. adjoint.
Médecine opératoire	SOUBEYRAN, agrégé.

Agrégés en exercice

MM. GALAVIELLE.	MM. LEENHARDT.	MM. DELMAS (Paul).
VEDEL.	GAUSSEL.	MASSABUAU.
SOUBEYRAN.	RICHE.	EUZIERE.
GRYNFELTT (Ed.).	CABANNES.	LECERCLE.
LAGRIFFOUL.	DERRIEN.	FLEIG (ch. d. fonct.)

Examinateurs de la thèse

MM. FORGUE, *Président.*	MM. GALAVIELLE, *Agrégé.*
RAUZIER, *Professeur.*	GAUSSEL, *Agrégé.*

La Faculté de Médecine de Montpellier déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leur auteur; qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

A MES MAITRES

DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MONTPELLIER

A MES MAITRES

DE L'INSTITUT PASTEUR DE PARIS

P. DELANOË.

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE DOCTEUR FORGUE

PROFESSEUR DE CLINIQUE MÉDICALE

MEMBRE CORRESPONDANT DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

Hommage de ma reconnaissance.

A MONSIEUR LE DOCTEUR RAUZIER

PROFESSEUR DE CLINIQUE MÉDICALE

Hommage de ma reconnaissance.

P. DELANOË.

A MONSIEUR LE DOCTEUR ROUX

DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR DE PARIS

MEMBRE DE L'INSTITUT ET DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

Hommage de ma reconnaissance.

A MONSIEUR F. MESNIL

PROFESSEUR A L'INSTITUT PASTEUR

Hommage de ma reconnaissance.

P. DELANOË.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534902_0021

L'IMPORTANCE DE LA PHAGOCYTOSE

DANS L'IMMUNITÉ DE LA SOURIS

A L'ÉGARD DE QUELQUES FLAGELLÉS

Il y a dix ans que Laveran et Mesnil ont, pour la première fois, dans un mémoire publié dans les *Annales de l'Institut Pasteur* (1), montré que l'immunité du rat, blanc ou pie, à l'égard du *T. Lewisi* Kent, est uniquement d'ordre phagocytaire.

Chez le rat, activement immunisé, ces deux savants ont montré que la destruction des trypanosomes a lieu dans la cavité péritonéale même, c'est-à-dire au lieu de l'injection, sans que les parasites puissent pénétrer dans la circulation sanguine. En observant en goutte pendante et en frottis colorés le liquide péritonéal d'un rat activement immunisé et récemment inoculé, Laveran et Mesnil ont très nettement vu toutes les phases de la phagocytose. Les flagellés, tout en gardant leur pleine mobilité, se piquent sur les phagocytes. Ceux-ci ne tardent pas à réagir et poussent de part et d'autre du parasite deux fins tentacules qui finissent par l'englober en totalité. Le trypanosome, qui, jusqu'à la fin, n'a cessé de se révolter contre la prise du leucocyte, une fois inclus dans le cytoplasme de ce dernier, est très rapidement digéré ; si bien qu'à la coloration, on ne retrouve, la plupart du temps, à l'intérieur des mononucléaires, que des boules irrégulières présentant les réactions de

(1) « Recherches morphologiques et Expérimentales sur le Trypanosome des Rats (*T. Lewisi* Kent)», nº du 25 septembre 1901. Voir aussi : *Trypanosomes et Trypanosomiases*, Paris, Masson, 1904.

la chromatine et qu'il est possible d'interpréter comme les derniers vestiges de la digestion des trypanosomes.

Chez le rat, passivement immunisé, auquel ils injectent successivement dans le péritoine un sérum très actif et des trypanosomes, Laveran et Mesnil constatent la destruction des parasites par phagocytose. Les flagellés, demeurés mobiles malgré l'action agglutinante du sérum, sont englobés en pleine vitalité et cela tout comme chez le rat en immunité active. Ajoutons que Laveran et Mesnil ont très minutieusement mis en évidence que les actions agglutinante et préventive du sérum *anti-Lewisi* sont des propriétés nettement distinctes.

Ainsi, dès 1901, Laveran et Mesnil établissent, les premiers, ces deux faits essentiels : l'immunité active et passive du rat à l'égard du *T. Lewisi* est fonction d'une *stimulation* phagocytaire ; les trypanosomes sont détruits en pleine vitalité.

En outre, dans leur mémoire, Laveran et Mesnil montrent que le cobaye est susceptible de s'infecter légèrement à la suite d'une inoculation péritonéale de *T. Lewisi* : ils constatent, en effet, pour la première fois, une discrète multiplication des parasites dans le péritoine de cet animal. Avec Kanthack, Durham et Blandford (1), ils établissent que le trypanosome des rats, inoculé dans le péritoine du cobaye, pénètre dans le sang où ils le retrouvent déjà vingt-quatre heures après l'inoculation. Les trypanosomes augmentent d'abord de nombre dans la circulation sanguine jusqu'à atteindre 1/20e à 1/50e des hématies, puis deviennent plus rares et enfin disparaissent. La disparition des trypanosomes du péritoine est due à la phagocytose.

Il ressort de ces expériences de Laveran et Mesnil que la phagocytose joue un rôle capital aussi bien chez le rat, animal réceptif, que chez le cobaye, animal réfractaire, infectés avec le *T. Lewisi*. C'est même pour ces auteurs le seul mode de disparition du parasite.

Levaditi et Sevin (2) montrent en 1905 que l'immunité de la souris et des calfats naturellement réfractaires au *T. paddæ*

(1) *Proceedings of the R. Society*, t. LXIV, 1898, et *Hygienische Rundschau*, nº 24, 1898.

(2) *Comptes Rendus de la Soc. de Biologie*, 15 avril 1905, p. 694, t. LVIII.

est une immunité d'ordre phagocytaire. Le trypanosome, avant de disparaître, est susceptible de se multiplier légèrement.

Sauerbeck (1), dans la consciencieuse étude qu'il a consacrée à l'histologie pathologique de l'infection des rats, des cobayes, des lapins et des chiens, par le Trypanosome du Nagana (*T. Brucei*), considère la phagocytose comme l'arme fondamentale de la défense. Par la méthode des coupes aussi bien que par celle des frottis, Sauerbeck a observé la phagocytose dans la rate, le foie, les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse et l'épiploon. Il a très rarement observé des figures typiques de phagocytose : il n'a constaté, la plupart du temps, dans les mononucléaires des viscères et dans les cellules qui leur sont propres (cellules de Kupffer pour le foie, cellules endo-alvéolaires pour le poumon et peut-être cellules endothéliales des sinus pour les ganglions lymphatiques) que des restes analogues à des noyaux de flagellés. Ce n'est qu'exceptionnellement qu'il a pu rencontrer dans les leucocytes « la forme ronde caractéristique avec un noyau et tout autour une couche de protoplasma et la racine du flagelle ».

En ponctionnant le péritoine des cobayes inoculés, depuis vingt-quatre à quarante-huit heures, avec *T. Brucei*, Sauerbeck a pu constater l'attachement des flagellés aux leucocytes, soit par leur extrémité antérieure soit par leur extrémité postérieure. Les trypanosomes attachés à un seul mononucléaire étaient au nombre de plusieurs, deux, trois et même quatre. Sauerbeck n'a pu constater l'englobement en pleine vitalité des éléments fixés. Il ne nie d'ailleurs pas le processus décrit par Laveran et Mesnil, « puisque ces auteurs l'ont constaté », mais il croit que ce processus doit être très rare. Sauerbeck pense que le trypanosome une fois attaché au leucocyte est d'abord paralysé par un poison que sécrète le globule blanc. Il perd alors ses mouvements et, lorsque le phagocyte s'apprête à l'englober, il est déjà réduit à l'état de « grumeaux » plus ou moins ronds. Bref, l'originalité de la conception de Sauerbeck est que le trypanosome, une fois fixé au phagocyte, est d'abord paralysé par

(1) *Zeitsch. f. Hyg. und Inf. Krankheiten*, 1905.

une sécrétion du globule blanc avant d'être incorporé. « Dans la règle, dit Sauerbeck, il se produit d'abord une fixation, puis une paralysie (1) ».

Rodet et Vallet (2), dans la rate du rat et du chien naganés (*T. Brucei*), constatent à l'approche de la mort et surtout après elle, une destruction très accentuée des trypanosomes en dehors des leucocytes. Pour eux, Sauerbeck a eu tort de négliger ce phénomène qu'il a vu le premier « pour exagérer l'importance de la phagocytose (3) ». Celle-ci n'a qu'un rôle secondaire. Elle se borne à enlever les déchets des trypanosomes détruits par l'action trypanocide de la rate. Du reste, celle-ci ne fait aucun doute. En mélangeant, entre lame et lamelle, une goutte de sang nagané et une goutte de suc splénique, Rodet et Vallet n'ont-ils pas constaté la mort rapide des trypanosomes?

Laveran et Thiroux (4) ont critiqué les résultats obtenus par Rodet et Vallet en ce qui concerne la propriété trypanolytique de la rate. Leurs expériences ont été faites chez des cobayes inoculés avec *T. togolense* (virus fort de Martini) et des chiens inoculés avec *T. Pecaudi*. Pour Laveran et Thiroux, les frottis faits avec la rate sitôt après la mort ne montrent pas de trypanosomes désintégrés. L'extrait de rate ne jouit d'aucune action trypanocide. Les résultats de Rodet et Vallet s'expliquent en grande partie par des fautes de technique (5).

(1) « In der Regel aber wird wohl eine Fixirung und nachfolgende Lähmung den Process einleiten », p. 77 du tiré à part.

(2) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences* ; 28 mai 1906, 6 août 1906, 29 juillet 1907, et *Archives de Médecine Expérimentale*, juillet 1906.

(3) P. 479 du *Mémoire des Archives de Médecine Expérimentale.*

(4) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 1er et 29 juillet 1907, et *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXI, août 1907.

(5) Nous noterons ici, simplement à titre documentaire, que Jaffé (*Centr. f. Bakter. I, Orig.*, t. LV, f. 6, 6 septembre 1910, pp. 519-527) a montré que les produits d'autolyse de la rate du rat, du lapin et du cobaye, neufs ou naganés, exercent une action trypanocide marquée. Il est, en conséquence, légitime de se demander si, dans certaines expériences faites *in vitro*, Rodet et Vallet n'ont pas eu affaire, à leur insu, à des phénomènes d'autolyse. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que les expériences de Rodet et Vallet ont été faites, à Montpellier, *en été* (p. 481 du mémoire). On sait bien aujourd'hui que les endoferments cellulaires, responsables des phénomènes d'autolyse, ont leur optimum d'action à 38 et 40 degrés. Consulter à ce sujet l'excellente Revue de L. Launoy in *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 1908, t. VI.

Manteufel (1), en injectant des *T. Lewisi* dans le péritoine de rats immunisés activement ou passivement, a bien vu l'attachement des trypanosomes aux mononucléaires par leur extrémité non flagellée. Ce phénomène n'aurait cependant aucune importance : les trypanosomes, au cours de leurs mouvements, sont susceptibles de s'attacher à tout ce qu'ils rencontrent sur leur passage, globules rouges et bulles d'air aussi bien que leucocytes. Manteufel n'a pas vu l'attachement des trypanosomes être suivi d'englobement. « Une seule fois, il a pu observer, sans aucun doute, un trypanosome mobile, bien reconnaissable, à l'intérieur d'un globule blanc. » A l'examen des frottis colorés, l'auteur n'a vu à l'intérieur des leucocytes que de petits amas, plus ou moins irréguliers, ayant les réactions de la chromatine et qu'il interprète comme des vestiges de trypanosomes. Manteufel pense qu'il serait possible de rencontrer des trypanosomes intacts à l'intérieur des leucocytes, si la phagocytose était vraiment le mode normal de disparition de ces parasites. En réalité, la phagocytose ne joue qu'un rôle secondaire. Les leucocytes se bornent à enlever les restes des flagellés, dont la destruction relève exclusivement de la propriété lytique des humeurs.

En février 1909, F. Mesnil et E. Brimont (2) ont étudié le mode de destruction des trypanosomes du Nagana du Togoland, *T. togolense* Mesnil et Brimont (3), inoculés dans le péritoine des souris en mélange *in vitro* avec le sérum d'un bouc infecté avec ce virus. Mesnil et Brimont ont constaté que la disparition des trypanosomes pathogènes a lieu chez la souris d'une manière identique à celle du *T. Lewisi* chez le rat immunisé. L'englobement du trypanosome du Nagana se fait même plus rapidement que celui du *T. Lewisi* ; les exemples de phagocytose se voient plus fréquemment si bien qu'au bout d'une demi-heure, il n'existe plus un seul trypanosome libre dans le péritoine d'une souris qui a reçu « un mélange de 0,20

(1) *Arbeiten aus dem Kaiserliches Gesundheitsamte*, novembre 1909.
(2) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXIII, février 1909.
(3) F. Mesnil. Sur l'identification de quelques trypanosomes pathogènes. *Société de Pathologie Exotique*, juin 1910.

à 0,25 centimètres cubes de sérum avec 0,4 à 0,5 centimètres cubes de sang dilué, c'est-à-dire un mélange qui protège à la limite et qui peut même amener une infection après un long retard ».

Toujours en février 1909, Massaglia (1) fit paraître un long travail dont une grande partie est consacrée à l'étude de l'immunité dans les trypanosomiases.

Massaglia commence, tout d'abord, par constater, d'accord en cela avec Laveran et Mesnil, que les sérums des animaux réfractaires (cobaye et lapin) n'ont pas d'action trypanocide sur le *T. Lewisi*, soit quand on mélange ces sérums *in vitro* au trypanosome, soit lorsqu'on les injecte à de jeunes rats en pleine infection sanguine (2).

C'est sur le cobaye que Massaglia poursuivit ses « recherches relatives à la manière dont les trypanosomes sont détruits quand on les inocule à des animaux réfractaires ». Les expériences de Massaglia portent sur *deux* cobayes de 300 et 400 grammes.

Pour Massaglia, le cobaye serait absolument réfractaire au *T. Lewisi*, qui ne passerait pas dans la circulation sanguine et serait détruit en quelques heures dans le péritoine, à l'endroit de l'injection. En faisant des ponctions abdominales de demi-heure en demi-heure, Massaglia aurait constaté que les trypanosomes ne commencent à être détruits qu'au bout d'une heure et demie à deux heures après le moment de l'injection. Jusqu'alors, les flagellés resteraient en parfaite intégrité. Il y a donc, de l'aveu même de Massaglia, une phase en quelque sorte latente, qui suit l'injection des parasites, au cours de

(1) Communication faite à la Société médico-chirurgicale de Modène, séance du 13 février 1909.

(2) Massaglia, en se servant de jeunes rats infectés pour éprouver l'action des sérums des animaux réfractaires, n'a fait qu'imiter Laveran et Mesnil. Ces derniers auteurs disent expressément : « Toutes nos expériences ont été faites avec de jeunes rats de 30 à 125 grammes. Avec ces rats, on a toujours des infections longues et intenses avec trois périodes bien nettes pour l'évolution du parasite. On peut donc, avec la plus grande facilité, reconnaître la perturbation que jette dans cette évolution parasitaire l'introduction d'un sérum, alors même qu'il n'arrête pas toute infection. » *Loc. cit.*, p. 708.

laquelle ceux-ci demeurent intacts; phase de durée sensible puisqu'elle peut persister deux heures, c'est-à-dire la moitié du temps nécessaire à la destruction de tous les parasites. Pour Massaglia, le rôle de la phagocytose, chez le cobaye, est sinon nul, du moins très secondaire. Ce sont les trypanolysines contenues dans le liquide péritonéal qui détruisent les microbes et nullement les phagocytes. La destruction des trypanosomes a lieu par un mécanisme analogue à celui qui se passe chez les animaux immunisés contre le vibrion de Koch (1). Les leucocytes n'apparaissent dans le champ de la lutte que quand les trypanosomes sont en grande partie détruits. Leur rôle est tout à fait secondaire. Il se limite à balayer du péritoine les résidus des trypanosomes. Quant à la lyse des parasites, elle est sous la dépendance exclusive de causes extra-cellulaires.

L'immunité active et passive du rat à l'égard du *T. Lewisi* serait également pour Massaglia d'ordre humoral.

Au mois de septembre 1909, Massaglia (2), étendant ses premières recherches, étudia, dans le laboratoire du professeur Laveran, le mode naturel de défense de certains vertébrés à sang froid — couleuvre à collier, tortues, grenouilles (maintenues à la température ordinaire ou chauffées), tritons, lézards — à l'égard du trypanosome du Surra, *T. Evansi* Steel, inoculé sous forme de sang de cobaye, de rat et de souris riche en parasites. Massaglia ne constate pas la phagocytose : les trypano-

(1) Cette comparaison est faite également par Mc Neal au cours d'un mémoire sur « le Cycle évolutif du *T. Lewisi* et du *T. Brucei* ». *Journ. of Inf Diseases*, vol. I, n° 4, 5 nov. 1904, p. 517-543. Voici le passage de Mc Neal auquel nous faisons allusion : « By injecting trypanosomes (*T. Lewisi*) into the peritoneal cavity of guinea pigs immunized to this organism, and subsequently examining the peritoneal fluid, Laveran et Mesnil were able to find various stages of ingestion of the protozoa by the leucocytes. We have attempted to confirm this by a similar procedure. Instead of phagocytosis, however, we could find evidence only of the immobilization and gradual solution of the trypanosomes in the peritoneal fluid. Stains made from time to time showed the protoplasm of the parasites paler than before, until finally it seemed to have dissolved. The process appeared to be quite analogous to that met with in the well-Known Pfeiffer's phenomenon. In other words, the trypanosomes disappear as the result of the presence and action of cytolytic agents rather than by phagocytosis. » P. 526-527.

(2) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 13 septembre 1909, p. 516.

somes sont très rapidement détruits en dehors des leucocytes.

Levaditi et Mutermilch (1) ont dernièrement appelé l'attention sur le mécanisme de la phagocytose.

En mélangeant, dans un tube à essai, 1 goutte de sang de souris naganée (*T. Brucei*), des globules blancs de cobaye neuf et du sérum trypanolytique, préalablement inactivé, de cobaye saigné au moment de la crise (Rodet et Vallet, Massaglia), ces auteurs constatent que les trypanosomes, après s'être fixés sur les leucocytes, sont finalement englobés.

L'attachement des trypanosomes aux leucocytes est un phénomène *d'ordre physico-chimique*, dans lequel la vitalité des leucocytes n'est pour rien. Il se produit aussi bien avec des leucocytes tués (par séjour prolongé à 0 degré, par congélations et décongélations successives, par chauffage à 45 degrés, 55 degrés et même 60 degrés) qu'avec des leucocytes vivants.

Cet attachement n'en est pas moins spécifique. Mélangés à une bouillie d'organe (foie ou rein), les trypanosomes se fixent exclusivement sur les leucocytes contenus dans cette bouillie.

Le trypanosome, au cours de l'englobement, ne resterait mobile qu'autant que la région du noyau n'est pas atteinte, mais, « *à partir de ce moment, il se meut de moins en moins, finit par s'immobiliser et devient transparent* (trypanolyse) *avant qu'il soit totalement phagocyté* (1) ». Levaditi et Mutermilch pensent que les leucocytes vivants, excités par l'attachement de l'objet phagocytable, sécrètent un poison microbicide destiné à imprégner le trypanosome sensibilisé et à le détruire, avant qu'il soit complètement incorporé. Cette sécrétion aurait lieu au moment même de l'acte phagocytaire, car il a été impossible à Levaditi et à Mutermilch de retirer des globules blancs une substance capable de détruire *in vitro* les trypanosomes sensibilisés.

(1) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, séance du 18 juin 1910, t. LXVIII, p. 1079.

De cet ensemble de données bibliographiques, il ressort qu'il existe une divergence d'opinions : Laveran et Mesnil, Mesnil et Brimont décrivent des phénomènes de phagocytose tout à fait typiques; Massaglia, Rodet et Vallet pensent au contraire que la destruction des trypanosomes relève exclusivement de l'action trypanocide des humeurs, les leucocytes jouant seulement le rôle de balayeurs de déchets.

Sauerbeck est d'opinion mixte : la destruction des trypanosomes est due au leucocyte. Celui-ci est l'âme même de la défense. Seulement la destruction des parasites, à cause de l'activité toxique des globules blancs, arriverait avant que l'englobement soit complet. Telle est aussi, nous l'avons vu, l'opinion de Levaditi.

Il n'était donc pas sans intérêt d'envisager à nouveau l'importance de la phagocytose dans la destruction des flagellés. Nous avons dans ce but étudié, sur les conseils de notre maître M. Mesnil, professeur à l'Institut Pasteur, l'immunité de la souris à l'égard d'un certain nombre de protozoaires.

L'IMMUNITÉ NATURELLE DE LA SOURIS A L'ÉGARD DES CULTURES DE BOUTON D'ORIENT ET DE KALA-AZAR TUNISIENS

(*Leishmania tropica* J. H. Wright, 1903, et *Leishmania infantum* Ch. Nicolle, 1908)

La souris blanche possède à l'égard des cultures (1) de Kala-Azar et de bouton d'Orient tunisiens une immunité naturelle

(1) Ces cultures ont été aimablement fournies à M. Mesnil par M. Ch. Nicolle, de Tunis. Elles ont été depuis régulièrement entretenues dans le laboratoire de M. Mesnil par passages en milieu Novy, simplifié par Ch. Nicolle.

Voici la manière exacte dont nous préparons le milieu de culture : sel marin, 6 grammes; gélose *non lavée*, 14 grammes; eau, 900 cent. cubes. Répartir dans des tubes sans neutralisation ou alcalinisation préalable, puis stériliser à l'autoclave par un chauffage à 120 degrés un quart d'heure. Les tubes sont encapuchonnés et conservés à l'abri de la lumière. Au moment de s'en servir, on en fait fondre le contenu dans de l'eau bouillante. On les laisse ensuite se refroidir et quand la température est descendue à 45-50 degrés, on

très forte, que des injections péritonéales fréquemment répétées et faites pendant des mois n'arrivent pas à vaincre (1). Ainsi du 7 octobre 1910, au commencement de mars 1911, nous avons, sans aucun succès, inoculé, à cinq ou six jours d'intervalle, douze souris avec des cultures de ces virus arrivées au maximum de leur développement. Les injections étaient faites à la dose de un demi-centimètre cube environ.

Le mécanisme de cette immunité naturelle est des plus simples. Il est le même qu'il s'agisse de Bouton d'Orient ou de Kala-Azar. Il est particulièrement facile à mettre en évidence avec les cultures de Bouton d'Orient; car ces cultures, en milieu Novy simplifié, sont sensiblement plus riches que celles de Kala-Azar. Sitôt injectés, les leptomonas de culture se piquent sur les lymphocytes, gros et petits, qui normalement abondent dans le péritoine de la souris. Cette fixation des flagellés est très rapide. Déjà, une minute après l'injection, on constate qu'un grand nombre de leptomonas sont adhérents. En quinze minutes, la fixation est quasi totale. Le nombre des flagellés attachés à un leucocyte est très variable. On peut en constater jusqu'à 10 à 12 sur un seul globule blanc. C'est ordinairement par l'extrême bout du flagelle que les leptomonas se piquent sur les leucocytes, mais ils peuvent y adhérer soit par leur extrémité postérieure, soit plus rarement en un point quelconque du corps.

On peut aussi constater, mais rarement, la fixation d'un leptomonas sur un globule rouge; cette fixation a lieu par le bout du flagelle. Elle peut être telle que le leptomonas n'arrive pas à se débarrasser de l'hématie, qu'il secoue avec violence.

y incorpore, en volume, un tiers de sang *défibriné* de lapin. On mélange intimement gélose et sang. Les tubes, afin de permettre le milieu d'adhérer au verre, sont conservés, inclinés, à 28° une nuit. Le lendemain, on les encapuchonne de nouveau et on les place à 37 degrés seulement deux à trois heures. Cela suffit pour permettre au liquide de condensation de se former en petite quantité. Les tubes sont ensuite placés à la glacière, où on peut les conserver pendant un mois et plus, à une température voisine de 0 degré, jusqu'au moment de l'ensemencement. Le sang défibriné doit être aussi frais que possible. Il est entendu qu'avant la préparation des milieux on en éprouvera la stérilité par ensemencement en bouillon simple.

(1) MM. A. Laveran et A. Pettit ont pu déterminer chez la souris et le rat des infections légères, essentiellement guérissables, en leur inoculant une émulsion de rate et de foie de chien infecté de Kala-Azar tunisien.

La fixation des leptomonas n'a donc pas lieu exclusivement sur les globules blancs. Nous n'avons pas vu plusieurs leptomonas attachés à un seul globule rouge. Par contre, ce fait est très fréquent avec les mononucléaires.

Les lymphocytes ne tardent pas à réagir à la fixation des protozoaires. On peut les voir, sous le microscope, une fois accommodés à la température du laboratoire, montrer un petit promontoire protoplasmique juste au point de fixation du flagelle, puis, de part et d'autre de celui-ci, allonger deux minces et fins pseudopodes, transparents et dépourvus de granulations cytoplasmiques. Ces pseudopodes, peu à peu, grandissent et finissent par saisir en totalité le leptomonas. Une fois l'englobement complet, le leucocyte rentre ses pseudopodes et régularise son contour. Peu après, on voit apparaître en plein cytoplasme, une vacuole claire, transparente, ronde ou plus fréquemment ovalaire, à contours parfaitement nets, dans laquelle on distingue le leptomonas, renflé en boule, dont les contours épousent étroitement ceux de la vacuole. Celle-ci, on le devine, n'est rien autre qu'une vacuole digestive. Rapidement, en effet, le protozoaire inclus devient transparent; les granulations cytoplasmiques de son protoplasme sont animées d'un mouvement brownien très net, diminuent de grosseur, puis de nombre, et ainsi jusqu'à disparition complète. Il est d'ailleurs facile de contrôler par des préparations colorées toutes les phases de la digestion phagocytaire qu'on aura pu suivre simplement entre lame et lamelle. Il suffit même de déposer sur une lame une goutte de l'exsudat péritonéal d'une souris neuve et une goutte de culture et de recouvrir le tout d'une lamelle pour assister *in vitro* à toutes les phases de l'englobement.

La technique que nous avons employée, pour la coloration des frotlis de liquide péritonéal, est la suivante : fixation humide aux vapeurs osmiques (solution aqueuse à 1 p. 100) quinze secondes; après dessiccation, surfixation à l'alcool-éther, parties égales, deux minutes. Laisser sécher. Laver à l'eau courante et colorer vingt minutes dans une dilution de Giemsa, au 10e (1 cent. cube de Giemsa pour 10 cent. cubes d'eau distillée).

Il est nécessaire que la coloration suive de près la fixation. Des préparations fixées seulement depuis 48 heures se colorent mal, dans tous les cas moins bien que si elles avaient été colorées de suite après la fixation.

Pour les frottis, les dilutions de Giemsa au 10e valent mieux que les dilutions au 50e ou au 100e. Celles-ci, en raison du long espace de temps qu'elles exigent (12 à 15 heures au minimum), donnent lieu à un abondant précipité rougeâtre qui gêne la lecture des préparations. Pour les coupes, au contraire (nous détaillerons plus loin leur mode de coloration), les dilutions au 50e ou au 100e valent mieux : le précipité rougeâtre est entièrement enlevé par l'acétone au moment de la déshydratation.

C'est en pleine vitalité que les leptomonas de culture sont englobés. On se rend surtout compte de ce fait quand on a affaire à des leptomonas fixés par leur extrémité postérieure. Le flagelle, qui est alors la dernière partie englobée, reste mobile jusqu'à complète disparition. Nous n'avons jamais constaté d'action lytique en dehors des globules blancs. Le sérum de la souris n'a d'ailleurs aucune action nocive sur les cultures de Bouton d'Orient et de Kala-Azar; par l'immunisation, on développe simplement une légère propriété agglutinative qu'on ne peut d'ailleurs affirmer que dans le cas des cultures de Bouton d'Orient, puisque le Kala-Azar donne déjà en culture de nombreux amas de microbes. Notons, en passant, que les leptomonas des cultures de Bouton d'Orient s'agglutinent de façon quelconque; ils se rapprochent les uns des autres et s'entremêlent sans disposition spéciale. On ne peut donc trouver ici confirmation de la théorie de Prowazek (1905), qui prétend qu'au cours de l'agglutination des trypanosomes en rosaces, le blépharoplaste sécrète une substance visqueuse qui tend à les réunir les uns aux autres. Si cette théorie était exacte, les leptomonas auraient tendance à se grouper par leurs extrémités antérieures.

Bref, l'immunité naturelle de la souris à l'égard des *Leishmania tropica* et *infantum*, en culture, est une immunité d'ordre exclusivement phagocytaire. Les leptomonas, introduits dans le péritoine, sont l'objet d'une phagocytose rapide. En une

1/2 heure à 3/4 d'heure, une souris neuve se débarrasse totalement des flagellés contenus dans 1/2 cent. cube de culture arrivée au maximum de richesse.

Enfin, même en injectant de très fortes doses de culture dans le péritoine d'une souris, 2 à 3 cent. cubes par exemple, on ne constate jamais la pénétration des éléments flagellés dans le sang. La défense est victorieusement assurée par les seuls lymphocytes de la cavité péritonéale.

L'IMMUNITÉ NATURELLE DE LA SOURIS

A L'ÉGARD DES CULTURES DE TRYPANOSOMES DIVERS

(*T. rotatorium* Mayer, 1843; *T. noctuæ* Schaudinn, 1904; *T. scardinii* Brumpt, 1906; *T. phoxini* (1) Brumpt, 1906; *T. Theileri* Laveran, 1902, et *T. vespertilionis* Battaglia, 1905).

La culture de ces divers flagellés a été faite, par nous, au laboratoire de M. Mesnil, dans le milieu de Novy-Nicolle, dont nous avons donné la formule et le mode de préparation.

Nous avons isolé le *T. rotatorium* Mayer le 8 mai 1911, d'une *Rana esculenta* L., achetée sur les quais de la Seine. La culture de ce trypanosome fut entretenue pendant 4 mois. Elle se fait très abondante du 8e au 10e jour, à la température ordinaire du laboratoire. L'isolement fut fait en ponctionnant la veine abdominale, que l'on découvre après incision et écartement de la peau. Cette veine est recouverte par une légère couche musculaire, qu'il est facile de cautériser complètement sans léser aucunement le vaisseau. A la ponction, on recueille, par aspiration, plus de 1/2 cent. cube de sang. Ce procédé nous a paru plus pratique et plus fidèle que celui de la ponction du cœur : il nous a constamment donné des succès. Nous avons inoculé aux souris des cultures de *T. rotatorium* des 5e, 6e, 7e, 8e et 9e générations, faites du 5 juin au 26 juillet 1911.

(1) Nous employons les noms spécifiques créés par Brumpt et dérivés du nom générique du poisson infecté. Mais il est très possible qu'il n'y ait pas là d'espèces distinctes du *T. Danilewskyi* Laveran et Mesnil, de la carpe.

Le *T. noctuæ*, avec lequel nous avons expérimenté, provient du laboratoire du professeur Hartmann. Nous l'entretenons régulièrement depuis le 15 mai 1911. Les cultures de *T. noctuæ* sont remarquables par leur richesse.

Nous avons isolé *T. scardinii* de rotengles (*Scardinius erythrophtalmus*) provenant de l'étang de Garches. L'isolement fut pratiqué le 25 mars 1910. Ce trypanosome fut entretenu pendant plus d'un an en milieu artificiel. Nous avons inoculé aux souris des cultures provenant des 15e, 16e, 18e et 19e générations faites du 27 novembre 1910 au 30 janvier 1911.

Nous avons isolé *T. phoxini* de vairons (*Phoxinus lœvis* Agass.) achetés sur les quais de la Seine. L'isolement, difficile en raison de la petitesse de l'animal, fut fait, pour la première fois, par nous le 29 novembre 1910. Nous avons entretenu ce trypanosome pendant 8 mois en milieu Novy-Nicolle. Nous avons inoculé aux souris des cultures provenant des 3e, 4e, 5e et 6e générations faites du 14 février au 7 mars 1911.

Nous avons isolé (1), le 15 janvier 1911, un trypanosome voisin de *T. Theileri* des bœufs d'Alfort, dans le service de M. le professeur Moussu. La première culture fut faite en bouillon simple, les suivantes en milieu Novy-Nicolle. Nous avons inoculé aux souris les cultures des 5e, 6e, 7e et 8e passages, ensemencées du 3 au 23 mars 1911 et injectées au maximum de leur croissance, vers le 7e jour.

Le *T. vespertilionis*, qu nous a servi, est dû à l'amabilité de M. Ch. Nicolle. Ce trypanosome, qui fut cultivé par nous pendant près de deux ans, est isolé depuis 1907; et à partir de ce moment, il fut sans interruption cultivé en milieu de Novy-Nicolle.

L'immunité naturelle de la souris à l'égard de ces divers flagellés est très forte. Les microbes ne pénètrent jamais dans le sang quand ils sont injectés dans le péritoine, même à haute dose. Ils sont détruits sur place, en 1/2 heure au plus. On peut se faire une idée très exacte de la rapidité de destruction en mélangeant sur lame une goutte de culture et une goutte de liquide péritonéal d'une souris neuve. Très rapidement, les

(1) *Soc. de Pathologie exotique*, séance du 11 octobre 1911, t. IV, no 8.

Crithidia et les trypanosomes de culture sont la proie des mononucléaires (1). Fixés généralement par leur extrémité postérieure, on peut, en 3 à 4 minutes, assister à leur englobement complet. Les flagelles, dernière partie englobée, restent mobiles jusqu'à la fin, c'est-à-dire jusqu'à ce qu'ils soient entièrement pris par les deux minces pseudopodes du leucocyte. C'est donc en pleine vitalité que les flagellés des cultures sont détruits. La phagocytose est le seul mode de destruction des parasites, et il est très facile de s'en assurer.

L'IMMUNITÉ DE LA SOURIS A L'ÉGARD DE T. LEWISI KENT, 1881.

A. — Immunité naturelle. Son mécanisme

Les souris sont, en général, réfractaires au *T. Lewisi*. Le fait est classique.

Nous avons vu que les flagellés de diverses cultures de protozoaires sont très rapidement phagocytés *in vivo* comme *in vitro* par les leucocytes de la souris.

Avec le *T. Lewisi*, il n'en va pas de même. *In vitro*, le mélange de sang trypanosomé et de liquide péritonéal n'est pas suivi de phagocytose.

Chez le vivant, l'injection des trypanosomes dans le péritoine est suivie d'une phase latente, de durée variable, pendant laquelle les flagellés, non seulement se conservent, mais peuvent se multiplier, ce qu'atteste la présence de petites formes et de rosaces à 4 ou 5 éléments au plus. Levaditi et Sevin, nous l'avons vu, ont constaté un fait analogue chez les calfats naturellement réfractaires au *T. paddæ*.

Les trypanosomes peuvent, en partie, facilement pénétrer du péritoine dans le sang. Après une forte inoculation (1/2 à 1 cent. cube de sang trypanosomé), déjà 20 minutes à 1/2 heure après,

(1) Les polynucléaires sont susceptibles, mais dans une très faible mesure, de jouer le rôle de phagocytes.

on peut se rendre compte de cette pénétration : en examinant une goutte de sang prise à la queue, on y constate de rares trypanosomes. Ceux-ci augmentent de nombre pendant plusieurs heures (4 à 5 en moyenne), puis leur nombre décroît lentement. Les trypanosomes cessent d'être visibles dans le sang plus rapidement que dans le péritoine. La disparition totale des parasites a lieu entre 36 et 48 heures. Laveran et Mesnil, avant nous, ont, à ce sujet, fait des constatations analogues. « Après avoir injecté, disent-ils, du sang riche en trypanosomes dans le péritoine des souris blanches, nous avons vu que les trypanosomes se retrouvaient dans le péritoine et dans le sang après 24 heures; au bout de 48 heures, ils avaient toujours disparu (1). »

Lorsqu'on inocule une dose faible, 1 à 2 gouttes de sang, pour se rendre compte de la présence des trypanosomes dans le torrent circulatoire, il faut sacrifier les souris, aspirer le sang du cœur et le centrifuger : on trouvera des trypanosomes dans le culot de centrifugation.

Bref, que l'on injecte une dose forte ou faible, la pénétration des trypanosomes dans le sang a toujours lieu; de telle sorte que, pour résoudre le problème de l'immunité naturelle de la souris, il faut se demander ce que devient le *T. Lewisi*, non seulement dans le péritoine, mais encore dans les viscères.

Lorsqu'on ponctionne, à intervalles rapprochés, le péritoine d'une souris inoculée, on constate très nettement, lors des deux ou trois premières ponctions, que les trypanosomes sont tous ou presque tous entièrement libres et dans un parfait état d'intégrité. Roudsky (2) a vu, à l'état frais, des mononucléaires de souris phagocyter des trypanosomes, et cela par le même processus que Laveran et Mesnil ont fait connaître chez le rat immunisé et chez le cobaye. Nous avons, de notre côté, fait semblable constatation. Mais il faut ajouter que la phagocytose se constate rarement. Et c'est bien là qu'est la difficulté du problème. Le plus souvent, on n'observe que des trypanosomes fixés par leur extrémité postérieure sur les leucocytes. Ceux-ci

(1) *Loc. cit.*
(2) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 6 mai 1911, t. LXX, p. 693.

ne réagissent pas à l'attachement des protozoaires et l'on peut, pendant des heures, observer des trypanosomes piqués sur des mononucléaires, sans que la moindre réaction se manifeste de la part du globule blanc. Les leucocytes de la souris, placés entre la lame et la lamelle, *à la température du laboratoire*, se trouvent dans des conditions très désavantageuses pour phagocyter le *T. Lewisi*. Nous avons vu qu'il en était tout autrement avec les flagellés des cultures. Pour que la phagocytose du *Lewisi* puisse se faire *in vitro*, il faut qu'elle débute dans le péritoine et qu'elle soit déjà en partie faite. De là, sans aucun doute, la difficulté que l'on éprouve à la constater. Comme l'acte phagocytaire est difficilement visible, dans l'espoir de mieux le rencontrer, nous n'avons pas hésité, ainsi que l'a fait Massaglia chez le cobaye, à multiplier les ponctions péritonéales. A partir d'un nombre de ponctions, variable suivant les souris, nous avons constaté la présence de trypanosomes détruits en dehors des leucocytes. Dès lors, il fallait se demander si la disparition des parasites est due à la phagocytose ou à l'action trypanolytique du liquide péritonéal, ou encore à ces deux processus réunis. Après de nombreuses recherches, nous avons la conviction que la phagocytose est le seul processus normal de destruction des trypanosomes. Par la répétition des ponctions, on met le péritoine dans un véritable état pathologique. On sait bien aujourd'hui qu'il suffit d'une simple piqûre de la paroi abdominale pour amener, durant plusieurs heures, une leucopénie plus ou moins manifeste. On ne s'entend pas d'ailleurs sur le déterminisme de cette leucopénie.

Pour les uns, du fait seul de la piqûre, il y a destruction d'un nombre plus ou moins considérable de leucocytes; pour les autres, la piqûre amène la transformation du fibrinogène du liquide péritonéal en fibrine; le réseau de fibrine, en se constituant, enserrerait dans ses mailles plus ou moins de leucocytes. Quoi qu'il en soit, il paraît établi que toute piqûre de la paroi du ventre, si minime soit-elle, surtout chez un animal aussi petit que la souris, peut entraîner des lésions appréciables. Nous pensons que celles-ci sont constituées, pour une grande part, par des altérations leucocytaires. Nous avons, en effet, constaté sur les frottis de liquide péritonéal, prélevé

après plusieurs piqûres abdominales, des leucocytes avec des noyaux en karyolyse, réduits à l'état de boules régulières, mais d'inégale grosseur, répandues dans le cytoplasme : témoignage histologique indéniable de la souffrance du péritoine. Grâce aux altérations des leucocytes, les substances trypanolytiques contenues dans les phagocytes diffusent dans le liquide péritonéal. Cette hypothèse se renforce du fait que nous avons assisté *in vitro* à la destruction extracellulaire des trypanosomes. En voici, entre plusieurs autres, un exemple des plus convaincants : le 22 mars 1911, nous inoculons, dans le péritoine d'une souris neuve de 20 grammes, un centimètre cube de sang citraté d'un jeune rat très richement infecté. Treize heures après, le sang de la souris contient quinze à vingt parasites par champ (oculaire compensateur n° 4, objectif Stiassnie n° 5). Nous en mettons une goutte entre lame et lamelle que nous lutons à la paraffine. Nous traitons de même une goutte de liquide péritonéal de ponction. Les trypanosomes, sitôt qu'ils viennent d'être retirés de l'organisme, sont tous, sans exception, très mobiles. Les préparations, de contrôle, au Giemsa, montrent qu'il en est bien ainsi et que les trypanosomes sont en parfait état d'intégrité. Au bout de dix minutes, manifestement au bout d'un quart d'heure, alors que les flagellés contenus dans la goutte de sang conservent leur aspect normal, les trypanosomes contenus dans le liquide péritonéal montrent des altérations de plus en plus accentuées. Celles-ci débutent à certains endroits de la préparation; puis, elles s'étendent et se généralisent. C'est d'abord une paralysie notable du trypanosome; le flagelle et la membrane ondulante se mouvant si paresseusement qu'il devient incapable de se déplacer. Finalement, c'est l'immobilité complète. Alors, le protoplasme devient clair, vitreux; il montre des vacuoles d'inégale grosseur, de plus en plus nombreuses. Le contour du trypanosome finit par ne plus être reconnaissable; on ne voit plus que le flagelle auquel adhère le blépharoplaste. Bref, le trypanosome a littéralement fondu, en l'espace de quinze à vingt minutes, sous l'œil qui l'observait. La destruction des trypanosomes s'échelonne pendant plusieurs heures. Au bout de six heures, presque tous les trypanosomes sont détruits.

Les trypanosomes, contenus dans la goutte de sang, gardent, au contraire, leur intégrité première. Roudsky (1) a observé, de son côté, que « le sérum sanguin de la souris blanche constitue un milieu favorable pour la conservation *in vitro* du *T. Lewisi* ».

Ainsi, en conservant, entre lame et lamelle, le liquide péritonéal de souris infectées, les trypanosomes, très mobiles au sortir de l'organisme, peuvent se détruire complètement en l'espace de quelques heures et se réduire à l'appareil flagellaire.

Il faut, en conséquence, se résigner à ne ponctionner qu'une fois le péritoine des souris et à faire, sitôt après la prise, des frottis avec le liquide péritonéal de ponction. Le seul inconvénient de cette technique est de multiplier beaucoup le nombre des animaux mis en expérience. On devra également ne tenir compte que des préparations d'une parfaite coloration : de la sorte, on constate que les trypanosomes retirés des péritoines des souris, quel que soit le moment de la ponction, sont en parfaite intégrité. Par contre, sur ces mêmes frottis, on rencontre, par lame, deux ou trois figures indéniables de phagocytose.

Il est probable que la digestion des trypanosomes se fait très vite; la digestion du protoplasme serait très rapide, car, avec la plupart des auteurs, nous n'avons que très rarement observé dans les leucocytes des trypanosomes renflés en boule à l'intérieur de vacuoles digestives. Nous avons seulement vu, plongeant en plein cytoplasme cellulaire et tranchant vigoureusement par contraste de coloration, le noyau et le blépharoplaste. Fréquemment, le blépharoplaste existe seul. Ailleurs, nous avons observé dans les leucocytes des enclaves ayant la réaction de la chromatine nucléaire; sont-ce des restes de trypanosomes digérés?

Nous avons aussi recherché la destinée des trypanosomes dans les viscères. Nous fûmes obligé, dans ce but, d'inoculer aux souris une forte proportion de virus (au moins 1/2 cent. cube de sang; la plupart du temps, 1 à 2 cent. cubes de sang).

(1) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, séance du 12 mars 1910.

Avec les doses faibles (1 à 2 gouttes), la quantité de trypanosomes qui passent dans la circulation est si faible, qu'il serait puéril de vouloir les rechercher sur les coupes. Nos recherches, tant par la méthode des frottis que par celle des coupes, ont porté principalement sur la rate, le foie, les poumons, les ganglions lombaires, la moelle osseuse ; accessoirement, sur l'épiploon et la paroi abdominale fixée en pleine épaisseur musculaire. Les souris étaient tuées au chloroforme ou asphyxiées au gaz d'éclairage.

D'une manière générale, au point de vue de la coloration des trypanosomes, les frottis nous ont donné des résultats bien supérieurs à ceux des coupes. Nous n'avons pas réussi à différencier le flagelle des trypanosomes contenus dans les coupes. Par contre, nous avons coloré avec une grande netteté le corps même du trypanosome ainsi que les noyau et blépharoplaste : le cytoplasme apparaît en bleu délicat, très finement alvéolaire ; le noyau en rouge ; le blépharoplaste en violet foncé.

La méthode que nous avons employée pour la fixation et la coloration des coupes est à peu près celle qu'a fait connaître dernièrement Giemsa (1). Comme fixateur, le sublimé hydro-alcoolique acétique de Schaudinn et Prowazek :

Solution saturée aqueuse de sublimé	2 parties.
Alcool absolu ou à 95 degrés.	1 partie.
Acide acétique pur, 1 p. 100 du total.	

Suivant les conseils donnés par M. Borrel dans ses Cours, c'est à la glacière, à une température voisine de 0 degré, que nous avons fait nos fixations. Comparativement, les fixations faites à basse température nous ont paru supérieures à celles faites à la température du laboratoire. Suivant la grosseur des pièces, le temps de la fixation varie de 5 à 12 heures. Les poumons ont été fixés *in toto*, suivant l'excellente pratique préconisée par M. Borrel dans un Mémoire des *Annales de l'Institut Pasteur* (2), la trachée est liée avant que d'ouvrir le thorax. Puis, tout l'arbre pulmonaire est enlevé d'un bloc, plongé

(1) *Deutsche mediz. Woch.*, 1910, n° 12.

(2) « Tuberculose pulmonaire expérimentale. Etude anatomo-pathologique du processus obtenu par injection intra-veineuse », t. VII, p. 593.

à même le fixateur et recouvert d'une couche d'ouate hydrophile suffisante pour empêcher les poumons de flotter. Au bout de 5 à 6 heures, pour faciliter la pénétration du fixateur, on pratique au bistouri des incisions dans les poumons. Au bout de 12 heures, la fixation est faite.

La ligature de la trachée avant l'ouverture du thorax a pour but de fixer le poumon en extension physiologique. Sans cette précaution, les alvéoles s'affaissent parfois si bien que les coupes deviennent absolument illisibles. Avec des alvéoles moyennement distendues, les coupes de poumons apparaissent comme une dentelle bien ajourée; et il devient très simple de s'y retrouver.

Au sortir du fixateur, afin d'être bien certain d'enlever tout le sublimé, les fragments d'organes sont plongés pendant trois jours dans l'alcool à 70° iodé. Puis, on les fait passer par la série classique : alcool à 80 degrés, 24 heures; alcool à 95 degrés, 24 heures; alcool à 100 degrés, 12 heures; xylol, 12 heures; xylol-paraffine, 12 heures; paraffine, 12 heures. Les coupes sont débitées à 6 μ et colorées au Giemsa en solution faible : 1 goutte pour 2-5 cent. cubes d'eau distillée. Laisser agir trente-six à quarante-huit heures, et renouveler le bain colorant au bout de vingt-quatre heures. La déshydratation, après lavage à l'eau courante, a lieu dans des mélanges, à proportions variables, d'acétone et de xylol. Il est pratique de mettre ces mélanges dans des tubes Borrel étiquetés 1, 2, 3 et 4, et de porter les lames successivement du tube 1 au tube 4.

Les mélanges contenus dans les tubes sont les suivants :

Tube I.	Acétone	95	cent. cubes.
	Xylol	5	—
Tube II.	— Acétone	70	—
	Xylol	30	—
Tube III.	— Acétone	30	—
	Xylol	70	—
Tube IV.	— Xylol pur.		

Après passage dans le tube 4, il ne reste plus qu'à monter au baume.

D'après S.-B. Wolback et S.-H. Mc Kee, l'addition de colo-

phane à l'acétone (20 p. 100 de colophane) empêcherait la décoloration de l'éosine. Nous n'avons pas obtenu de meilleurs résultats en appliquant ce procédé (1).

Nous devons tout de suite dire que, sur les nombreuses coupes que nous avons pratiquées, nous n'avons pas trouvé une seule figure histologique susceptible d'être interprétée nettement comme le résultat de la phagocytose. Nous avons simplement rencontré dans les phagocytes des enclaves analogues à celles des leucocytes du péritoine. Par contre, nous avons constaté avec la dernière netteté que les trypanosomes contenus dans les viscères, et notamment dans la rate (2), sont en parfait état d'intégrité; ce qui rend très improbable leur destruction par trypanolyse.

Il nous est arrivé à maintes reprises de voir des trypanosomes piqués sur les leucocytes et à divers stades de phagocytose sur des frottis de rate et de ne rien constater de semblable sur les coupes. Ce résultat s'explique par l'imparfaite coloration des trypanosomes autant que par le trop grand tassement des éléments cellulaires dans les coupes. Du fait de la compression des leucocytes, il y a une réelle impossibilité à dire si les trypanosomes sont à l'intérieur des leucocytes ou simplement à côté d'eux, étant donné que le cytoplasme du phagocyte et celui du trypanosome se colorent de la même façon, en bleu plus ou moins foncé. Ajoutons que Sauerbeck, dans les coupes de rate de rat nagané, a éprouvé des difficultés de même ordre. L'auteur signale qu'il est très difficile de dire si les parasites sont à l'intérieur ou à l'extérieur des globules blancs, « car le protoplasme du globule et celui du parasite se colorent dans le même ton ». Les trypanosomes, dans la rate, se rencontrent au niveau de la pulpe splénique et surtout au niveau des sinus veineux. Nous n'avons pas noté leur présence au niveau des corpuscules de Malpighi.

Une lésion est constante au niveau du foie : l'hyperplasie

(1) *Journ. of med. Res.*, t. XXIV, n° 2, avril 1911.

(2) Quand on examine, entre lame et lamelle, un fragment de rate trypanosomée disséquée dans de l'eau physiologique, il passe dans le champ du microscope, une série de formes bizarres que l'on pourrait prendre pour des trypanosomes altérés et qui ne sont en réalité que des amas d'hématoblastes. Aussi ne doit-on faire confiance qu'aux préparations colorées.

des cellules de Kupffer. Celle-ci peut présenter tous les degrés. Tantôt, elle se limite au simple boursouflement du noyau; tantôt, c'est toute la cellule qui est tuméfiée, allongée en un long fuseau, parallèlement au vaisseau. Il est probable que les cellules de Kupffer en hyperplasie abandonnent la paroi des capillaires, car ceux-ci peuvent être dénudés sur un parcours plus ou moins long. L'endothélium des capillaires hépatiques joue vraisemblablement un rôle actif dans la phagocytose des trypanosomes. Il nous est cependant impossible d'en fixer exactement l'importance, car nous n'avons trouvé dans le cytoplasme des cellules endothéliales que des fragments irréguliers, ayant les réactions de la chromatine et qu'on ne pouvait qu'hypothétiquement rapporter à des trypanosomes dégénérés. Pour Sauerbeck, il n'est pas douteux que les cellules de Kupffer phagocytent les trypanosomes du Nagana, chez le rat nagané. Seulement, la digestion du protozoaire se ferait si rapidement qu'on ne peut le retrouver qu'à l'état de vestiges méconnaissables.

Les capillaires hépatiques des souris infectées sont plus riches en globules blancs que normalement. On y rencontre peu de lymphocytes, surtout des mononucléaires gros et moyens et quelques mastzellen. Le cytoplasme des mononucléaires des capillaires contient fréquemment des enclaves chromatiques.

L'abondance des trypanosomes dans les vaisseaux du poumon contraste singulièrement avec leur rareté dans les vaisseaux des autres viscères. Cela est, sans doute, dû à ce que les poumons sont, dans un temps donné, traversés par une quantité de sang infiniment plus grande que celle qui traverse les autres organes. Nous avons facilement trouvé des trypanosomes jusque dans les fins capillaires, à peine plus larges qu'un globule rouge, qui rampent à la surface des alvéoles. Ces trypanosomes n'étaient séparés de la lumière alvéolaire que par la couche endothéliale limitante. Nous n'avons jamais constaté la pénétration des trypanosomes dans l'intérieur des alvéoles. *L'endothélium alvéolaire ne joue donc aucun rôle dans la destruction de T. Lewisi.* Nous rappelons, par comparaison, que Sauerbeck a constaté la pénétration de *T. Brucei* dans les

alvéoles des poumons du rat, et la phagocytose de ce trypanosome par l'endothélium alvéolaire.

Le tassement des éléments lymphatiques est tel au niveau des ganglions lombaires qu'on ne peut avoir aucun renseignement utile de l'examen de la couche corticale et du système caverneux. Le tissu sous-capsulaire donne seul des renseignements utiles : à son niveau, les cellules lymphatiques sont écartées les unes des autres et les trypanosomes peuvent facilement être mis en évidence. On note leur intégrité parfaite. On trouve également des trypanosomes en parfait état dans les fins capillaires du tissu graisseux qui entoure incomplètement la capsule du ganglion.

La moelle osseuse des fémurs et des tibias n'a été examinée qu'en frottis. Elle contient de rares trypanosomes, tous intacts.

La phagocytose doit être accentuée au niveau de l'épiploon, à la surface duquel nous avons rencontré, dans un réseau de fibrine, un grand nombre de leucocytes parfois littéralement bourrés d'inclusions chromatiques.

En somme, les coupes renseignent sur la distribution topographique des trypanosomes dans les viscères et l'existence dans les leucocytes de nombreuses inclusions chromatiques qui sont vraisemblablement des trypanosomes en voie de digestion. En plus, elles montrent très nettement l'absence de trypanolyse en dehors des globules blancs.

B. — Souris réceptives.

Mécanisme de la guérison. Immunité active et passive.

Il était classique d'admettre jusqu'ici que la souris est réfractaire au *T. Lewisi*. En modifiant expérimentalement ce virus, et, pour employer l'expression de MM. Laveran et Pettit, en le « renforçant », Roudsky, le premier, a pu inoculer en série des souris (1). Il déclare d'ailleurs, avec les auteurs, que cet ani-

(1) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 5 et 12 mars 1910, 12 novembre 1910; et *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 5 janvier 1911.

mal est réfractaire non seulement au virus normal, mais encore aux cultures de celui-ci.

Les faits que nous apportons corroborent les données de Roudsky en les élargissant, si on peut ainsi dire. Nous avons pu, en effet, à notre grande surprise, infecter d'emblée des souris avec le *Lewisi* normal, tel qu'on le trouve soit chez un rat d'égout (infection spontanée), soit chez un rat blanc ou pie (infection expérimentale), soit encore dans les cultures (1).

Les souris ont été infectées par inoculation d'une simple goutte de sang prise à la queue d'un rat, soit au moment de la période d'état de l'infection sanguine, soit à celle de la multiplication des parasites. On peut, au lieu de sang, se servir du liquide péritonéal d'un jeune rat récemment inoculé. Le pourcentage des résultats positifs n'est pas plus élevé quand on se sert d'un sang riche en formes de multiplication. Les souris de 7 à 8 grammes ne sont pas plus sensibles que les souris de 15 à 20 grammes.

Nos expériences ont été faites avec 3 origines différentes de *Lewisi,* que nous numérotons 1, 2 et 3. Les *Lewisi* 2 et 3 ont été isolés par nous de rats d'égout. En faisant des inoculations péritonéales à l'aide d'une goutte de sang de rat infecté, sur 26 *souris* inoculées avec le *Lewisi* 1, nous avons eu 6 résultats positifs; sur 10 *souris* inoculées avec le *Lewisi* 2, 4 succès; et sur 42 *souris* inoculées avec le *Lewisi* 3, seulement 5 succès. On peut, de ces 3 séries d'expériences, conclure que les différentes races de *Lewisi* ne sont pas également inoculables d'emblée à la souris; elle peut être complètement réfractaire à certaines races.

La souris peut également être infectée par la voie sous-cutanée, qui est aussi bonne que la voie péritonéale. Nos injec-

(1) Nous avons, pour la première fois, signalé dans les cultures de *T. Lewisi* de petits trypanosomes qui, après fixation humide aux vapeurs osmiques et coloration lente au Giemsa, ont, en moyenne, 7 μ 8 de long sur 1 μ 7 de large. Le blépharoplaste fait souvent saillie tout à l'extrémité postérieure du parasite. Ces petits trypanosomes de culture ressemblent beaucoup aux « small trypanosomes » signalés par Swellengrebel et Strickland dans l'intestin de la puce du rat, *Ceratophyllus fasciatus* Bosc. Consulter à ce sujet la note que nous avons fait paraître à la *Société de Biologie*, séance du 6 mai 1911, p. 704, t. LXX.

tions, pour la plupart, par simple commodité d'étude, ont été faites dans le péritoine.

Nous avons pu infecter des souris en leur inoculant des cultures faites en Novy-Nicolle. Nous avons constamment eu un pourcentage de résultats positifs plus élevé avec les cultures qu'avec le sang du rat. Et cette différence, très certainement, ne tient pas à ce que la dose de culture contenait plus de parasites que celle du sang; car, on n'a pas de résultats meilleurs en inoculant à des souris de fortes doses de virus; l'immunité naturelle, quand elle existe, est, en effet, une immunité très solide, que l'on ne peut faire fléchir en injectant de grandes quantités de trypanosomes. Alors que, sur 26 souris inoculées dans le péritoine avec une goutte de sang à *Lewisi* 1, 6 seulement prennent la maladie; sur 23 souris inoculées dans le péritoine avec des cultures de ce virus, 11 s'infectent. De même, sur 42 souris inoculées avec du sang à *Lewisi* 2, 5 succès; et sur 19 souris inoculées avec les cultures de ce virus, 10 succès. Il faut en conclure que *T. Lewisi* en culture perd un peu de sa spécificité étroite pour le rat, et que, de ce fait, il peut mieux infecter la souris. Rappelons, à ce sujet, que Roudsky, dans la première note qu'il a communiquée, indiquait comme idée directrice d'élucider l'influence des passages en milieux de culture sur l'évolution de *T. Lewisi*.

Il nous a semblé que la maladie n'évolue pas chez la souris avec cette régularité ponctuelle que Laveran et Mesnil ont fait connaître chez le jeune rat. L'infection du sang se fait soit en même temps, soit après celle du péritoine. La durée de la maladie est très inégale : en moyene, 15 jours; maximum, 24 jours; minimum, 4 à 5 jours. La disparition des parasites a parfois lieu brusquement; bien plus souvent, elle se fait lentement, progressivement, durant 2 à 3 jours. Les formes de multiplication dans le péritoine et dans le sang sont absolument identiques à celles du rat. A noter dans certains cas la présence, seulement durant la phase de multiplication des parasites, de trypanosomes sans flagelle libre, quoique avec une membrane ondulante bien développée, et surtout de formes à blépharoplaste seul, sans noyau, et qui, à la coloration, nous paraissaient être en parfaite intégrité. Ces formes à

blépharoplaste seul sont toujours très rares, au nombre de 4 ou 5 au plus sur un frottis. Nous avons dernièrement constaté la présence de formes à blépharoplaste seul dans le sang de jeunes rats, pesant 15 grammes, inoculés depuis 5 à 8 jours, en pleine période de multiplication sanguine des parasites.

A la période d'état de l'infection, les trypanosomes, chez la souris comme chez le rat, sont d'une régularité parfaite.

Il est plutôt exceptionnel que l'infection de la souris soit légère. Le plus souvent, il y abondante multiplication des parasites. Notamment, les rosaces sont, dans le sang, quelquefois si nombreuses qu'on peut en rencontrer avec un objectif 5, jusqu'à 7 à 8 dans un champ microscopique. L'infection trypanosomienne peut, ainsi que l'a signalé Roudsky, entraîner la mort. Nous avons observé celle-ci 2 fois sur 233 cas, dont 55 positifs. La multiplication des parasites dans ces 2 cas mortels a duré jusqu'à la mort, survenue 3 et 5 jours après l'inoculation. Le sang était si riche en parasites qu'il était manifestement décoloré, comme un liquide rosé. Aucune bactérie, aérobie ou anaérobie, n'a cultivé. Une fois sur deux, la mort est survenue brusquement, comme chez un rat nagané.

A vrai dire, nous avons observé la mort 5 fois. Seulement, dans 3 cas, le sang des souris mortes nous a fourni sur gélose simple une abondante culture microbienne. En conséquence, nous n'avons pas cru devoir attribuer ces 3 décès à l'infection trypanosomienne.

Comme lésions anatomo-pathologiques macroscopiques, chez les deux souris dont la mort a pu être avec vraisemblance imputée au *T. Lewisi*, nous avons observé une dégénérescence granulo-graisseuse accentuée du foie. Les veines intralobulaires apparaissent sous forme de taches rouge foncé, irrégulièrement arrondies, entourées du tissu lobulaire jaune pâle. La rate était grosse, violacée, très congestionnée. Les reins étaient normaux. Chez une souris, nous avons noté un léger œdème du poumon avec de rares ecchymoses.

A l'examen microscopique, nous avons observé une atteinte profonde de la cellule hépatique. Les cordons de Remak, comprimés par la dilatation des capillaires, étaient partiellement détruits. Dans les capillaires, nous avons noté une accumula-

tion considérable de leucocytes, formés en majeure partie de mononucléaires (moyens et gros) et de plasmazellen; pas de mastzellen, pas d'hématies nucléées.

A. Pettit (1) a montré que, dans diverses trypanosomiases expérimentales, le foie subit, du fait de l'accumulation de leucocytes, formant manchon autour des vaisseaux hépatiques, une véritable transformation lymphoïde. D. Roudsky (2) a observé la même lésion chez les souris inoculées avec le *T. Lewisi* Kent *renforcé*. Nous n'avons rien constaté de semblable chez les deux souris mortes d'infection trypanosomienne et chez les souris en cours d'infection. L'accumulation des leucocytes a lieu simplement dans les capillaires.

La transformation lymphoïde du foie telle que l'a observée Roudsky semble donc bien, ainsi que l'affirme A. Pettit, répondre à une propriété nouvelle acquise par le *T. Lewisi* Kent *renforcé*.

Nous ajouterons que les tout jeunes rats inoculés avec le *T. Lewisi* normal ne présentent pas la transformation lymphoïde du foie, *même quand ils succombent à l'infection trypanosomienne*. Nous en avons observé dernièrement 1 cas très net. Un jeune rat de 15 grammes, inoculé de sang trypanosomé le 9 octobre, meurt le 30 du mois. A l'autopsie, nous notons une transformation granulo-graisseuse accentuée du foie, avec teinte jaune manifeste, mais sans trace aucune de transformation lymphoïde.

Avec le *Lewisi* n° 1, nous n'avons pas réussi les passages en série de souris à souris. Du moins, avons-nous subi des échecs répétés. Les inoculations étaient faites, dans le péritoine, à la dose de quelques gouttes de culture ou de sang. Nous donnons ici le résumé des expériences que nous avons faites :

(1) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, séance du 4 février 1911, t. LXX, p. 165, et *Archives internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, fasc. 3-4, vol. XXI.

2. *Loc. cit.*

Première expérience : Le 27 décembre 1910, 10 souris blanches de 12 à 15 grammes sont inoculées avec une culture riche, datant du 17 novembre (culture du 5e passage en milieu artificiel. Il y avait alors 5 mois que le trypanosome était isolé). Quatre souris s'infectent. Treize jours après, le sang d'une des souris infectées, riche en parasites, est inoculé à la dose de 2 gouttes à 6 souris neuves de 12-15 grammes. Aucune ne s'infecte.

Deuxième expérience : Le 17 janvier 1911, 6 souris neuves de 10-12 grammes sont inoculées avec une goutte de sang, très riche en trypanosomes adultes et en formes de multiplication, d'un rat pesant 70 grammes et inoculé depuis 5 jours. Sur 6 souris, une seule s'infecte. Le 20 janvier, la souris réceptive a dans le sang de très nombreux parasites. Les formes de multiplication et les rosaces sont nombreuses. On inocule 3 à 4 gouttes de sang à 6 souris de 10 à 12 grammes. Aucune ne s'infecte.

Troisième expérience : Le 17 novembre, nous inoculons 3 à 4 dixièmes de cent. cube de culture de *T. Lewisi* à 3 souris (culture datant du 16 septembre 1910, correspondant au 4e passage en milieu artificiel. Il y avait alors 4 mois que le trypanosome était isolé). Deux souris s'infectent, dont 1 gravement; l'infection trypanosomienne a, en effet, duré dans ce cas 24 jours. Le 20 novembre, le sang de la souris gravement infectée, riche en formes de multiplication, est inoculée à 1 souris de 16 grammes, qui s'infecte. L'infection est moins grave que dans le cas précédent; elle ne dure que 13 jours. Le 25 novembre, le sang de la souris du 2e passage, riche en formes de multiplication, est inoculé à 1 souris de 15 grammes qui s'infecte gravement. La maladie dure 18 jours. Le 12 décembre, 8 à 10 gouttes de sang de la souris du 3e passage, riche en formes de multiplication, sont inoculées à 4 souris de 9-11 grammes. Aucune ne s'infecte.

Quatrième expérience : Le 3 novembre 1910, 3 souris de 12-18 grammes sont inoculées avec le liquide péritonéal, riche

en formes de multiplication, d'un rat de 70 grammes, inoculé depuis 4 jours. Deux souris s'infectent. Le 10 novembre, le sang d'une des 2 souris infectées, riche en formes de multiplication, est inoculé à raison de 4 gouttes à 3 souris neuves de 11, 13 et 17 grammes. Deux souris s'infectent, dont 1 gravement. Le 15 novembre, le sang d'une des 2 souris infectées, riche en formes de multiplication, est inoculé à 6 souris neuves de 12-15 grammes. Aucune ne s'infecte.

Cinquième expérience : Le 20 décembre 1910, nous inoculons à 6 souris de 12-15 grammes le mélange de 3 cultures ensemencées à des dates différentes (cultures du 22 octobre, du 10 novembre et du 17 novembre ; toutes du 5e passage en milieu artificiel). Trois souris s'infectent. L'infection trypanosomienne dure en moyenne 8-10 jours. Le 2 décembre, le sang d'une des souris infectées est inoculé à 4 souris de 12-15 grammes. Une seule souris s'infecte : l'infection trypanosomienne dure 10 jours. Le 30 décembre, le sang de la souris du 2e passage, riches en formes de multiplication et en trypanosomes adultes, est inoculé à 5 souris neuves de 15-17 grammes. Deux souris s'infectent ; chez 1 souris, l'infection trypanosomienne dure 6 jours ; chez l'autre, seulement 3 à 4 jours. Le 4 janvier 1911, le sang de la souris la plus infectée est inoculé à 5 souris de 10-12 grammes. Aucune ne s'infecte.

Sixième expérience : Le 17 janvier 1911, 6 souris de 12-15 grammes sont inoculées avec 1 goutte de sang d'un rat, inoculé depuis 5 jours, riche en formes de multiplication. Une seule souris s'infecte. Le 20 janvier, 12 souris sont inoculées avec 1 goutte de sang de la souris infectée, riche en formes de multiplication. Aucune souris ne s'infecte.

Afin de faciliter la lecture de nos résultats, nous les avons groupés dans le tableau suivant :

Nous pouvons donc affirmer, en toute certitude, en raison des 6 essais infructueux que nous avons faits et qui portent sur un total de 83 animaux, que le *T. Lewisi* n° 1 n'est pas

inoculable en série à la souris. Le virus, au cours des passages, loin de s'exalter, semblerait plutôt s'atténuer. Nous faisons, cependant, des réserves sur ce point attendu que la marche de l'infection trypanosomienne chez des souris, inoculées dans des conditions identiques, est très variable d'un animal à l'autre.

SÉRIES	NOMBRE DE SOURIS				NOMBRE DE SOURIS INFECTÉES			
	Du 1er passage.	Du 2e passage.	Du 3e passage.	Du 4e passage.	Lors du 1er passage.	Lors du 2e passage.	Lors du 3e passage.	Lors du 4e passage.
Ire série.	10	6	»	»	4	0	»	»
IIe série.	6	6	»	»	1	0	»	»
IIIe série.	3	1	»	»	2	1	»	»
IVe série.	4	4	6	»	2	2	0	»
Ve série.	6	4	5	5	3	1	2	0
VIe série.	6	12	»	»	1	0	»	»

La guérison survient chez les souris réceptives par phagocytose. Celle-ci, comme chez les souris qui ont d'emblée l'immunité naturelle, est difficile à constater lorsqu'on examine, entre lame et lamelle, le liquide péritonéal de ponction. Les meilleurs renseignements sont fournis par les frottis colorés, sur lesquels on peut rencontrer de bonnes figures de phagocytose. Les coupes ne donnent rien de particulier; des inclusions chromatiques dans les mononucléaires de la rate, des poumons, du foie, dans les cellules de Kupffer hyperplasiées.

Les souris qui ont eu une première infection sont toujours réfractaires à une seconde inoculation, quelle que soit la dose de trypanosomes inoculée dans le péritoine. La souris, comme

le rat, est donc susceptible de s'immuniser activement à l'égard du *T. Lewisi*.

Nous avons constamment observé que les trypanosomes passent dans le sang lors de la 2e inoculation. Le fait est plus rare lors de la 3e inoculation. La 4e inoculation n'est jamais suivie d'infection sanguine : les parasites sont alors détruits dans la cavité péritonéale même.

Nous avons immunisé nos souris par injection de sang trypanosomé de rat ou de souris. Avec le sang de rat, il faut aller avec prudence et se contenter d'inoculer 1 à 2 gouttes. Les doses plus fortes sont mal supportées, et souvent les souris meurent vers la 6e et 7e réinoculation. Il vaut mieux injecter du sang de souris infectée. On n'a pas alors à craindre l'effet toxique des injections et la phagocytose des globules rouges ne vient pas compliquer celle des trypanosomes. On peut encore immuniser des souris avec du sang de souris, puis au moment où l'on désire étudier le mécanisme de l'immunisation active, inoculer du sang de rat. La destruction des globules rouges du rat est alors tardive, celle des trypanosomes précoce. Les deux phénomènes se succèdent, et on peut les étudier l'un après l'autre.

La plupart de nos recherches sur l'immunité active ont été faites sur des souris qui avaient reçu au minimum 4 à 5 injections.

La première chose qui frappe chez une souris en immunité active est l'agglutination des trypanosomes. Celle-ci a lieu dès que l'injection est faite. Au bout de 2 à 3 minutes, on assiste à la formation de gros amas de trypanosomes, affectant ou non la forme de rosaces. Les trypanosomes, et cela dépend de l'importance du traitement que l'on a fait subir à l'animal, peuvent être simplement agglutinés, et alors à cause de leur mobilité persistante ils se disposent en rosaces (Laveran et Mesnil), ou à la fois agglutinés et paralysés. La paralysie n'est d'ailleurs jamais totale. Chez les souris qui ont reçu près de 20 injections, les trypanosomes conservent encore quelques mouvements de la membrane ondulante et du flagelle. *Nous n'avons jamais observé la lyse des trypanosomes en dehors des éléments cellulaires.* L'immunité active de la souris, si poussée

soit-elle, fait donc apparaître simplement la propriété agglutinante, jointe ou non à la propriété paralysante.

La destruction des trypanosomes, par phagocytose, chez les souris en immunité active, est facile à observer. La phagocytose est précoce. Déjà 2 à 3 minutes après l'injection, elle est manifeste. Elle est au maximum au bout de 10 à 20 minutes. On voit alors de gros amas de leucocytes, au milieu ou sur le pourtour desquels se rencontrent de nombreux trypanosomes à divers stades d'englobement. Les préparations colorées donnent souvent des déceptions : les amas de leucocytes et de trypanosomes sont si épais qu'ils prennent la coloration d'une manière très intense, et il est alors impossible de les utiliser. Les meilleurs renseignements sont fournis par des leucocytes isolés, ou par les petits amas de leucocytes. On peut alors étudier tous les stades de la phagocytose, depuis le simple attachement jusqu'à la présence dans le cytoplasme des noyaux et des blépharoplastes, ainsi que de simples enclaves chromatiques.

Nous avons injecté à des souris en immunité active des trypanosomes du sang de rat et de souris, débarrassés par centrifugation électrique des globules rouges et lavés deux fois à l'eau physiologique, ces différentes manipulations ne demandant pas plus qu'un 1/4 d'heure à 20 minutes. Nous avons, dans ce cas, constaté très nettement non seulement la phagocytose, mais aussi la destruction extra-cellulaire d'une partie des flagellés. Nous pensons que la centrifugation, si ménagée soit-elle, amène de graves altérations chez beaucoup de flagellés. Certains seraient même, de ce fait, complètement détruits, réduits au flagelle et au blépharoplaste ainsi que l'attestent les frottis du culot de centrifugation colorés au Giemsa. On comprend, étant donné le trouble apporté dans l'équilibre leucocytaire par la piqûre abdominale, que les trypanosomes, en voie d'altération grave, puissent continuer à se détruire avant même que la phagocytose se produise.

Quand nous avons étudié l'immunité naturelle, nous avons montré quelles précautions il fallait prendre à l'égard de la ponction du péritoine. Ici, c'est en quelque sorte l'envers de la médaille ; et les expériences, rapportées plus haut, montrent

quelles précautions il faut prendre vis-à-vis des trypanosomes que l'on injecte.

Pour manifester l'immunité passive, nous avons injecté à des souris neuves d'abord le sérum immunisant (sérum de rat ou de souris) et, 2 à 3 minutes après, le sang trypanosomé (sang de rat ou de souris). Il n'y a aucun inconvénient à injecter les trypanosomes d'abord, le sérum ensuite. Cette technique est préférable à celle qui consiste à injecter en même temps sérum et trypanosomes, mélangés *in vitro*. On évite ainsi la formation de trop gros amas de trypanosomes dus à l'action agglutinante du sérum.

L'immunité passive est exclusivement d'ordre phagocytaire. Ce phénomène saute aux yeux, tout autant que l'agglutination des trypanosomes, quand on inocule une dose forte d'un sérum immunisant très actif (2 cent. cubes de sérum pour 4 à 5 gouttes de sang trypanosomé). Très rapidement, au bout de 2 à 3 minutes, on constate, par ponction du péritoine, qu'un grand nombre de trypanosomes, demeurés parfaitement mobiles malgré l'action agglutinante, sont piqués sur les leucocytes par leur extrémité postérieure. Les trypanosomes, une fois piqués, ne se maintiennent pas en position plus ou moins perpendiculaire par rapport au leucocyte. Ils sont comme attirés invinciblement vers lui, si bien que tout le corps du flagellé arrive en contact avec le leucocyte. Nous avons pu voir ainsi des amas de 3 ou 4 leucocytes entièrement cernés par une véritable couronne de trypanosomes. Ceux-ci gardent toute leur mobilité. Ils se déplacent, comme en glissant, à la surface des leucocytes sans cependant pouvoir s'en détacher. Pour constater l'englobement du parasite entre lame et lamelle, nous répétons ici ce que nous avons déjà dit : il faut que cet englobement commence dans le péritoine. Il s'achève alors *in vitro*, mais il ne peut se faire intégralement entre lame et lamelle, du moins à la température du laboratoire.

Les leucocytes augmentent rapidement de nombre. Au bout de 20 à 25 minutes, ils forment de gros amas en marge desquels on reconnaît facilement la phagocytose à tous les stades. Les trypanosomes sont détruits en pleine vitalité. Leur dispa-

rition est plus ou moins rapide, suivant la quantité de sérum injectée. Avec une dose de sérum faible, égale à celle du sang, on retrouve des trypanosomes vivants et très mobiles 12 à 15 heures après. Avec une dose de sérum forte, en moins de 2 heures tous les parasites sont détruits.

CONCLUSIONS

Nous pouvons résumer ainsi l'ensemble de notre travail :

1° L'immunité naturelle de la souris à l'égard des cultures de *Leishmania tropica* Wright, de *Leishmania infantum* Ch. Nicolle; de *T. rotatorium* Mayer; de *T. noctuæ* Schaudinn; de *T. scardinii* Brumpt; de *T. phoxini* Brumpt; de *T. Theileri* Laveran et de *T. vespertilionis* Battaglia, est une immunité d'ordre exclusivement phagocytaire. Les flagellés de culture sont détruits sitôt qu'ils sont injectés dans le péritoine, et leur disparition est très rapide;

2° L'immunité naturelle de la souris à l'égard des cultures de *T. Lewisi* Kent est une immunité d'ordre exclusivement phagocytaire. La défense, dans ce cas, n'a pas seulement lieu dans le péritoine, mais aussi dans tout l'organisme. Dans le péritoine, la phagocytose se fait durant 36 à 48 heures. Elle s'effectue par étapes successives. C'est en quelque sorte une phagocytose perlée. De là, une réelle difficulté à la manifester. Dans les viscères, les parasites sont très rapidement détruits, si bien qu'on ne les retrouve plus dans les phagocytes qu'à l'état de vestiges tout à fait méconnaissables. Les coupes montrent nettement l'absence de trypanolyse en dehors des globules blancs; ce qui nous porte à considérer la phagocytose comme le seul mode de destruction des parasites;

3° Certaines souris sont susceptibles de s'infecter par le *T. Lewisi* Kent normal. Le pourcentage des souris infectées nous a paru plus élevé quand les inoculations étaient faites avec les cultures;

4° Les souris réceptives acquièrent l'immunité active. Celle-ci est d'ordre exclusivement phagocytaire. Ce fait est d'autant

plus saillant que l'immunité active a été elle-même plus poussée;

5° L'immunité passive des souris à l'égard de *T. Lewisi* Kent est d'ordre exclusivement phagocytaire. On s'en rend bien compte quand on inocule une forte dose de sérum immunisant par rapport à celle du sang trypanosomé;

6° Les flagellés sont détruits en pleine vitalité, ce que l'on constate avec la plus grande netteté quand la dernière partie englobée est le flagelle : celui-ci reste alors mobile jusqu'à complète disparition.

Au moment de terminer ce travail, je tiens à exprimer à M. Mesnil, professeur à l'Institut Pasteur, mes sincères remerciements pour ses précieux conseils qui m'ont guidé, et pour l'accueil favorable que, sans me connaître au préalable, il a bien voulu me faire dans son laboratoire.

EXPLICATION DES FIGURES

DESSINÉES SUR LE PLAN DE LA TABLE, AVEC UNE CHAMBRE CLAIRE ZEISS, L'OCULAIRE COMPENSATEUR ZEISS N° 4 ET L'OBJECTIF A IMMERSION STIASSNIE 1/15e.

FIGURES 1, 2, 3, 4, 5 et 6. — Différents stades de la phagocytose des flagellés d'une culture de Bouton d'Orient par les mononucléaires de la souris.

FIG. 1. — Le leptomonas est piqué par l'extrême bout du flagelle sur un lymphocyte.

FIG. 2. — Plusieurs leptomonas, dont les flagelles sont déjà englobés, sont piqués sur un lymphocyte.

FIG. 3. — Dans un mononucléaire, on ne voit que le noyau et le blépharoplaste d'un leptomonas dont on ne distingue plus le contour; dans l'autre mononucléaire, un leptomonas renflé en boule et un leptomonas en voie d'englobement.

FIG. 4 et 5. — Mononucléaires avec des vacuoles dont le contenu prend une teinte acidophile quasi homogène. Il s'agit vraisemblablement d'un stade avancé de la phagocytose des leptomonas.

FIG. 6. — Dans le cytoplasme d'un mononucléaire, sous forme de granulations plus ou moins grossières, des enclaves chromatiques qui ne sont peut-être que le stade ultime de la digestion des leptomonas.

FIG. 7. — *Tryp. phoxini* BRUMPT dans le sang du vairon.

FIG. 8 et 9. — Deux trypanosomes de culture de *T. phoxini*. Chez l'un des 2 trypanosomes, le flagelle est en division avant que le blépharoplaste ne se soit divisé. Ce fait est fréquent. Entre lame et lamelle, on se rend compte que les flagelles de nouvelle formation s'agitent violemment, à la manière de véritables microgamètes, ce qui pourrait faire croire à un processus de fécondation.

FIG. 10 et 11. — Formes de culture d'un trypanosome voisin de *T. Theileri* que nous avons isolé des bœufs de France. On remarquera la forme *Leishmania*, que SWELLENGREBEL n'a pu retrouver dans les cultures du trypanosome des bœufs de Hollande.

FIG. 12, 13 et 14. — Phagocytose des flagellés de culture de *T. noctuæ* par les leucocytes de la souris. Préparation faite vingt minutes après avoir mélangé sur lame une goutte de liquide péritonéal de souris et une goutte

de culture. La figure 14 représente un polynucléaire qui a phagocyté un élément cultural.

Fig. 15. — Appareils flagellaire et blépharoplastique de *T. Lewisi* détruits en conservant entre lame et lamelle le liquide péritonéal de souris infectées.

Fig. 16. — Amas de leucocytes, dont on voit mal le contour cytoplasmique, et de *T. Lewisi*, à différents stades de phagocytose chez une souris qui a reçu 2 centimètres cubes de sérum immunisant et 1/4 centimètre cube de sang de souris infectée. En dehors des leucocytes, des granulations de Mastzellen.

Fig. 17. — Petits trypanosomes dans les cultures de *T. Lewisi*. On remarquera les petits trypanosomes renflés en boule et qu'on pourrait facilement prendre pour des kystes, n'était la coloration du flagelle.

Vu et permis d'imprimer :
Montpellier, le 23 novembre 1911.
Le Recteur,
Ant. BENOIST.

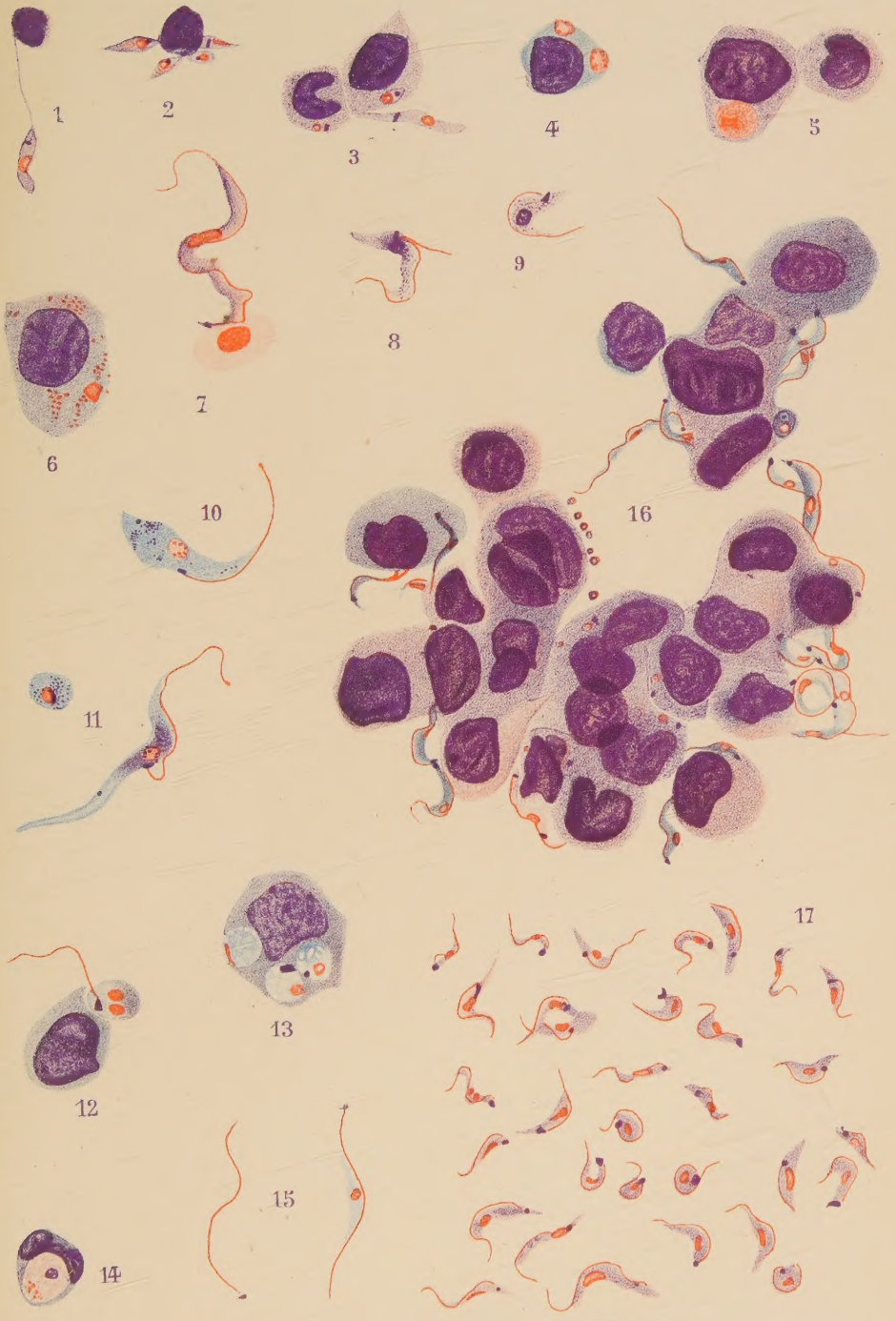
Vu et approuvé :
Montpellier, le 20 novembre 1911.
Le Doyen,
MAIRET.

SERMENT

En présence des Maîtres de cette École, de mes chers condisciples, et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Etre suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent, et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses! Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque!

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1 rue Cassette. — 8340.



Delanoë del.

V. Roussel lith.

Imp. L. Lafontaine, Paris.